

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 29 166 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/11
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/02
G 01 N 33/12

⑳ Aktenzeichen: 196 29 166.6
㉑ Anmeldetag: 19. 7. 96
㉒ Offenlegungstag: 27. 2. 97

DE 196 29 166 A 1

③0 Innere Priorität: ③2 ③3 ③1

22.08.95 DE 195313771 07.11.95 DE 195413687

㉑ Anmelder:

ZTB Zentrum Technologietransfer Biomedizin Bad
Oeynhausen GmbH, 32545 Bad Oeynhausen, DE

㉒ Vertreter:

Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

㉓ Erfinder:

Pühler, Alfred, Prof. Dr., 33739 Bielefeld, DE; Arnold,
Walter, Dr., 33619 Bielefeld, DE; Kriete, Guido, 33790
Halle, DE; Weidner, Stefan, 32602 Vlotho, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.86, S.6196-6200,
August 1989;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Analytisches Verfahren zur Feststellung der Abstammung verschiedener Materialien biologischer Herkunft
unter Verwendung mindestens eines Primers

⑤7 Ein neuer Primer sowie ein analytisches Verfahren zur
Feststellung der Abstammung verschiedener Materialien
biologischer (zum Beispiel tierischer, pflanzlicher) Herkunft
durch Untersuchung von in den Materialien vorhandener
DNA durch Amplifizierung und Fragmentierung der DNA und
nachfolgender Identifizierung der DNA-Fragmente sind Ge-
genstand der vorliegenden Erfindung. Das Verfahren ist
dadurch gekennzeichnet, daß die zur Untersuchung einge-
setzte DNA aus einem Gen mit geringer Mutationsrate
stammt, mittels Amplifikationsreaktionen markiert und am-
plifiziert, mit Restriktionsenzymen fragmentiert wird und die
markierten Restriktionsfragmente detektiert werden, wobei
das erhaltene charakteristische Restriktionsfragmentmuster
ausgewertet wird unter Vergleich mit Restriktionsfragment-
mustern, die aus Materialien bekannter Herkunft gewonnen
wurden oder an sich bekannt sind. Der erfindungsgemäße
Primer Mt-11 hat die Nucleotidsequenz
5'-GTT CTC CGT TTT TGG TTT ACA AGA C-3'.

DE 196 29 166 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Primer sowie ein analytisches Verfahren zur Feststellung der Abstammung verschiedener Materialien biologischer (zum Beispiel tierischer und pflanzlicher) Herkunft durch Untersuchung der in den Materialien vorhandenen DNA durch Amplifizierung und Identifizierung ausgewählter DNA-Fragmente mittels Restriktionsanalyse.

Ein großes Arbeitsfeld der Nahrungsmittelindustrie liegt in der Qualitätskontrolle von Nahrungsmittelkomponenten, zum Beispiel von Fleischsorten. Dabei kommt es nicht nur darauf an, den jeweiligen Zustand des Fleisches zu untersuchen, sondern auch dessen Herkunft zu ermitteln, da Fleisch vom Erzeuger oft bereits zerlegt, verschickt wird. Fleischsorten können deshalb häufig durch Sichtung nicht mehr identifiziert werden. Geschmack und Farbe scheiden als eindeutige Bestimmungsmerkmale aus. Sie können außerdem durch Gewürze verfälscht werden. Insbesondere auf der Stufe der Abgabe an den Endverbraucher sind Fleischsorten vor allem im verarbeiteten Zustand, zum Beispiel in Wurstwaren, nur bedingt zu identifizieren. Zur Zeit werden in der Regel analytische Methoden auf Proteinebene zur Identifizierung von Fleischproben angewendet. Dabei werden Antikörper gegen bestimmte Proteine eingesetzt, die mittels immunologischer Methoden, wie beispielsweise ELISA, zur Identifizierung führen. Zur Fleischidentifizierung kann auch das Isoenzymmuster herangezogen werden. Leider erweist sich dieses jedoch als abhängig von der Art des untersuchten Gewebes, wie beispielsweise Muskel-, Fett- und Lebergewebe. Mithin ist eine solche Analyse nur von geschultem Fachpersonal mit großer Erfahrung durchführbar. Desweiteren ist die Analyse auf Proteinebene bei weiterverarbeitetem Fleisch, wie beispielsweise in Wurstwaren, nur sehr unbefriedigend, da Proteine bei der Weiterverarbeitung häufig denaturiert werden und sich damit einer immunologischen Detektion entziehen.

Es ist bekannt, daß molekularbiologische, insbesondere molekulargenetische Techniken, bereits zur Identifizierung und Analyse von tierischem Material eingesetzt werden. Voraussetzung ist die Verwendung spezifischer DNA-Sonden zur Identifizierung von DNA aus tierischen Gewebeproben. Dabei werden Dot-Blot Verfahren angewandt, bei denen DNA-Isolate mit den spezifischen DNA-Sonden hybridisiert werden. Die Gewinnung der spezifischen Sonden gelingt mittels der 2-D-Gelelektrophorese, bei der tierartspezifische DNA-Bereiche anerkannt und isoliert werden können. Diese dienen dann als Sonde zur Identifizierung verschiedener Zielorganismen. Bei einem anderen Verfahren wird die DNA aus tierischem Gewebe isoliert, fragmentiert und selbst einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterzogen. Das dabei entstehende für die jeweilige Probe spezifische DNA-Punktemuster wird mittels Referenzmuster ausgewertet. Die geschilderten Analysen erweisen sich als relativ zeitaufwendig, so daß sie als eine schnelle Routinemethode nicht eingesetzt werden können.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem es gelingt, in relative kurzer Zeit sicher die Herkunft von Materialien, die zum Beispiel als Nahrungsmittel Verwendung finden, zu bestimmen.

Die WO 92/05277 beschreibt ein Verfahren zur Untersuchung von Genen aus Eukaryonten und Prokaryonten, wie z. B. Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Fischen

etc. Zunächst wird die DNA aus der Probe isoliert, dann ein bestimmtes Segment amplifiziert und dieses Segment dann weiter untersucht. Es folgt ein Vergleich mit bekannten DNA-Sequenzen.

Die CA-124 (1996) 136773 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung von DNA aus Fleischproben mittels DNA-bindenden Kunststoffharzen, die anschließend mittels Amplifizierungsreaktionen, wie zum Beispiel Polymerase-Kettenreaktionen (PCR), analysiert werden. Das Verfahren besteht ferner aus einer Restriktionsfragmentanalyse (RFLP).

Die CA-123 (1995) 2071f beschreibt die Verwendung von Cytochrom b-Genen zur Identifizierung von gekochtem und eingemachtem Thunfisch. Es wird als analytisches Verfahren PCR eingesetzt.

Die CA-123 (1995) 179729g beschreibt ein Verfahren zur Untersuchung der DNA in Fleischproben mittels PCR-Analyse. Die Cytochrom b-Gene entstammen von acht verschiedenen Säugetieren sowie fünf Vögeln. Ferner werden Restriktionsenzyme eingesetzt.

Die CA-115 (1991) 43089w beschreibt die Untersuchung der Gene von vier kanadischen Thunfischsorten mittels PCR-Analyse.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird gelöst durch einen Primer gemäß Anspruch 1 und ein Verfahren, in dem dieser Primer gemäß Anspruch 3 eingesetzt wird. Da für Amplifikationen gemäß PCR immer ein Primerpaar einzusetzen ist, ist auch der an sich bekannte Primer, der im Anspruch 7 genannt ist, notwendig, um das Verfahren nach Anspruch 3 auszuführen. Hierbei werden mittels molekulargenetischer Methoden bestimmte Bereiche eines im Tier- und Pflanzenreich, konservierten Gens amplifiziert und einer Spaltungsanalyse mit Restriktionsenzymen zugänglich gemacht. Die Längen der erzeugten DNA-Fragmente sind dabei für jede Tier- und Pflanzenart unterschiedlich und werden als Bestimmungsmerkmal herangezogen. Die Amplifizierung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts aus der Gesamt-DNA erfolgt mittels etablierter Amplifizierungsreaktionen, wie zum Beispiel Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von DNA-Oligonucleotiden gemäß Anspruch 2, die als Primer bezeichnet werden. Diese Sonden binden in hochkonservierten Bereichen der zu untersuchenden DNA. Bei Verwendung der fluoreszenzmarkierten Primer Mt-11 und Mt-2 können die nach Restriktionsspaltung erzeugten DNA-Fragmente auf Sequenziermaschinen, beispielsweise mit Hilfe der Lasertechnik, detektiert und im großen Probendurchsatz einer schnellen Auswertung zugänglich gemacht werden.

Für dieses Verfahren sind Gesamt-DNA-Mengen im µg-Maßstab ausreichend. Dies bedeutet, daß je nach Zellmaterial und Verarbeitung lediglich Probenmaterial im mg- bis g-Bereich erforderlich ist. Das erfindungsge-
mäßige Verfahren kann zur Bestimmung von Pflanzen- und Tiergeweben herangezogen werden und eignet sich insbesondere zur Identifikation verarbeitbarer Fleischsorten, wie zum Beispiel Wurstwaren, Tiefkühlkost, Wildbrett oder Meeresfrüchten, kurzum eßbaren Nahrungsmitteln. Damit können in Nahrungsmittelproben weitestgehend sämtliche verwendeten Pflanzen-, Tierarten nachgewiesen werden.

Vorzugsweise wird die Analyse zur Bestimmung tierischer Gewebe auf das Restriktionsfragmentmuster des Cytochrom b-Gens (cytb) gestützt, bei pflanzlichem Material erfolgt die Analyse durch Restriktionsfragmentanalysen amplifizierter Teilbereiche des Gens, das für die Ribulosediphosphat-Carboxylase kodiert. Das erfin-

dungsgemäße Verfahren nutzt bei der Identifizierung von Fleischsorten die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse des konservierten Gens Cytochrom b aus. Das Gen ist für phylogenetische Analysen im Tierbereich ein vielgenutztes Untersuchungsobjekt. Daher sind vom cyt-b-Gen bereits DNA-Sequenzen literaturbekannt, wie beispielsweise vom Huhn, von der Pute, vom Rind und vom Schwein. Das Gen cyt b ist Teil der genetischen Information der Mitochondrien, die in zahlreichen Kopien pro Zelle vorliegen. Erfindungsgemäß wurde eine nur ca. 550 Basenpaare lange DNA-Region am C-terminalen Ende des Gens ausgewählt. Die kurze Fragmentlänge ist von Vorteil, da hierdurch eine Fehlerquelle ausgeschaltet wird, die auf die Weiterverarbeitung des Gewebes, aus dem die DNA stammt, zurückzuführen ist. Bei der Weiterverarbeitung von Fleisch wird die DNA üblicherweise stark fragmentiert, so daß nur wenige DNA-Moleküle mit der bevorzugten gewünschten Länge die Prozeduren überstehen und somit als Template für PCR-Amplifikationen zur Verfügung stehen. Durch die erfindungsgemäß verwendete kurze DNA erhält man jedoch hinreichend viele Ausgangsfragmente, um eine sichere Analyse garantieren.

Die Fig. 1 zeigt eine Restriktionskarte des Cytochrom b-Gens von Gallus gallus (Huhn).

Die Fig. 2 zeigt eine Probenanalyse des erfindungsgemäßen Fingerprint-Verfahrens mit laserunterstützter On-Line-Analyse.

In den nachfolgenden Darstellungen wird die Erfindung beispielhaft anhand der Identifizierung von Fleischsorten aufgezeigt und näher erläutert.

Die Fig. 1 betrifft eine Restriktionskarte des Cytochrom-b-Gens von Gallus gallus (Huhn). Es wird die Restriktionskarte des Cytochrom-b-Gens des Huhns für 5 untersuchte Enzyme (HinfI, HaeIII, TaqI, DdeI und RsaI) gezeigt. Der Bereich, der erfindungsgemäß amplifiziert wird, ist unterhalb der Restriktionskarte mit einem Balken dargestellt. Die Primer Mt-11 und Mt-2 sind fluoreszenzmarkiert und binden in hochkonservierten DNA-Abschnitten. Die Lage der verwendeten Primer innerhalb des cyt-b-Gens ist durch zwei schwarze Kästchen hervorgehoben. Es hat sich herausgestellt, daß der amplifizierte Abschnitt nach Restriktion und elektrophoretischer Auftrennung eindeutige Unterschiede für verschiedene Tierarten ergibt. Befinden sich mehrere Schnittstellen eines verwendeten Restriktionsenzym im amplifizierten, insbesondere durch PCR amplifizierten Produkt, so werden beim Auswerten der Analyse im "On-Line"-System basierend auf Lasertechnik auf dem A.L.F-Sequenzierautomat nur die beiden fluoreszenzmarkierten Endfragmente erfaßt. Diese Ergebnisse sind jedoch für eine Identifizierung der jeweils untersuchten Fleischsorte bereits ausreichend, wie in Fig. 2 näher erläutert wird. Die Untersuchungen erfolgen vorzugsweise mit zwei Restriktionsenzymen verschiedener Schnittcharakteristik, so daß aufgrund der damit verbundenen Redundanz zusätzliche Sicherheit gewährleistet wird. Andererseits entstehen damit auch nicht zu viele Fragmente, wodurch die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse letztlich erschwert und kompliziert würde. Das Design der Primersequenz erfolgte in Anlehnung an publizierte Sequenzier-Primer (Kocher, T.D., et al., Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6196-6200 (1989)). Der Primer Mt-11 wurde dahingehend modifiziert, daß keine Erkennungsstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme innerhalb der Primersequenz vorkommen. Die er-

findungsgemäß eingesetzten Restriktionsenzyme sind sogenannte "Vielschneider", d. h. Enzyme, die eine vier Nukleotid lange Sequenz erkennen und somit relativ häufig DNA-spezifisch schneiden können.

Fig. 2 betrifft eine Analyse zur Untersuchung von Huhn und Putenfleisch. Da beide Fleischsorten geschmacklich und farblich einander sehr ähnlich sind, ist eine übliche Differenzierung schwierig. Um die Frage zu untersuchen, ob Putenfleisch mit Huhn angereichert wurde, ist eine sichere Analysetechnik erforderlich. Die durch mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Ergebnisse lassen eine deutliche Diskriminierung der beiden Fleischsorten erkennen, so daß bei Vorliegen beider Muster in einer Probe eindeutig auf eine Kontamination der einen Fleischsorte mit der anderen zu schließen ist. Die Spaltung der PCR-Produkte erfolgt in diesem Fall mit dem Restriktionsenzym HinfI. In der ersten Reihe befindet sich der Längenstandard (50-500). Die beiden nachfolgenden Reihen zeigen die Kontrollfragmente von Huhn bzw. Pute. Die drei letzten Reihen sind die Ergebnisse von Proben aus unterschiedlichem Zellmaterial (Probe 1 = Rind, Probe 2 = Schwein, Probe 3 = Huhn). Mithin ergibt sich aufgrund der Fingerprint-Analyse, daß erfindungsgemäß zwischen den unterschiedlichen Tierspezies, insbesondere zwischen Huhn und Pute, unterschieden werden kann.

Vorteilhaft am erfindungsgemäßen Verfahren ist, daß Standardmethoden der Gentechnologie, wie beispielsweise Amplifizierungstechniken, wie PCR, Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese, kombiniert werden können. Die DNA-Isolierung erfolgt abhängig vom verarbeiteten Zustand, entweder durch einfache Zelli-Lyse mit SDS/NaOH oder erhöhter Temperatur direkt vor dem Amplifikationsschritt oder durch Standard-Lysemethoden mit Hilfe von Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol. Es sind mithin weder Spezialkenntnisse noch lange Berufserfahrung notwendig.

Aufgrund der verwendeten Amplifizierungstechnologie und dem erfindungsgemäßen Primer Mt-11 und dem Primer Mt-2 können aus geringen DNA-Mengen Rückschlüsse auf die Herkunft der untersuchten Proben gezogen werden. Mithin ist eine hohe Empfindlichkeit gewährleistet.

Die Methodik ist universell anwendbar, da aufgrund der Auswahl eines DNA-Fragmentes, welches universell im Tierreich verbreitet ist, das erfindungsgemäße Verfahren auch dementsprechend breit angewendet werden kann. Da das DNA-Fragment, sofern das cyt-b-Gen untersucht wird, mit ca. 550 Basenpaaren relativ klein und bei der Weiterverarbeitung (z. B. als Wurst, Tiefkühlkost, Fertiggerichte, etc.) mit hoher Wahrscheinlichkeit noch vorhanden ist, können auch bereits verarbeitete Fleischproben analysiert werden. Dabei ist das erfindungsgemäße Verfahren grundsätzlich unabhängig von der Art des Zellgewebes. Im Gegensatz zu anderen Verfahren gemäß dem Stand der Technik, bei denen nur gezielt bestimmte Fleischsorten untersucht werden können, werden erfindungsgemäß auch nicht bekannte Beimengungen anhand der Restriktionsmuster erkannt. Es handelt sich hierbei also um ein echtes analytisches Verfahren und nicht nur ein Verfahren, was letztlich nur positiv bestätigen kann, was intuitiv vermutet wurde.

Desweiteren ist das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur Automatisierung geeignet. Die Auftrennung und Auswertung der erzeugten DNA-Fragmente ist prinzipiell auf üblichen Gelsystemen möglich, insbesondere auf denaturierenden Polyacrylamidgelen mit

nachfolgender Silberfärbung. Der Einsatz der fluoreszenzmarkierten Primer Mt-11 und Mt-2 in Verbindung mit DNA-Sequenziermaschinen erlaubt jedoch sogar eine On-Line-Analyse und damit einen entsprechend hohen Probendurchsatz. So gewährleistet das erfindungsgemäße Verfahren zur Zeit mit der augenblicklich verfügbaren Technik einen Probendurchsatz von bis zu 100 Proben pro Tag, die von einer Person bewältigt werden können.

Patentansprüche

1. Primer Mt-11 mit der folgenden Nucleotidsequenz:

5'-GTT CTC CGT TTT TGG TTT ACA AGA C-3'.

2. Verwendung des Primers gemäß Anspruch 1 als Primer.

3. Analytisches Verfahren zur Feststellung der Abstammung verschiedener Materialien biologischer (zum Beispiel tierischer, pflanzlicher) Herkunft durch Untersuchung von in den Materialien vorhandener DNA durch Amplifizierung und Fragmentierung der DNA und nachfolgender Identifizierung der DNA-Fragmente mittels eines Primers gemäß Anspruch 1, und der Verwendung des in Anspruch 7 genannten Primers, wobei die zur Untersuchung eingesetzte DNA aus einem Gen mit geringer Mutationsrate stammt, mittels Amplifikationsreaktionen markiert und amplifiziert, mit Restriktionsenzymen fragmentiert und die markierten Restriktionsfragmente detektiert werden, wobei das erhaltene charakteristische Restriktionsfragmentmuster ausgewertet wird unter Vergleich mit Restriktionsfragmentmustern, die aus Materialien bekannter Herkunft gewonnen wurden oder an sich bekannt sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen mit geringer Mutationsrate das für Cytochrome b (cytb) kodierende Gen ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3 und/oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Material, dessen Herkunft bestimmt werden soll, aus genießbaren Tieren, wie Huhn, Pute, Schwein, Rind, Schaf, Wild, Fisch, Meeresfrüchten stammt.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Fragmentierung der DNA mit mindestens zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt wird.

7. Verwendung des Primer Mt-2:

5'-GAC AAA TTT CCA TTC CAC CCA TAC TA-3'

in einem Verfahren gemäß Anspruch 3 bis 6.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

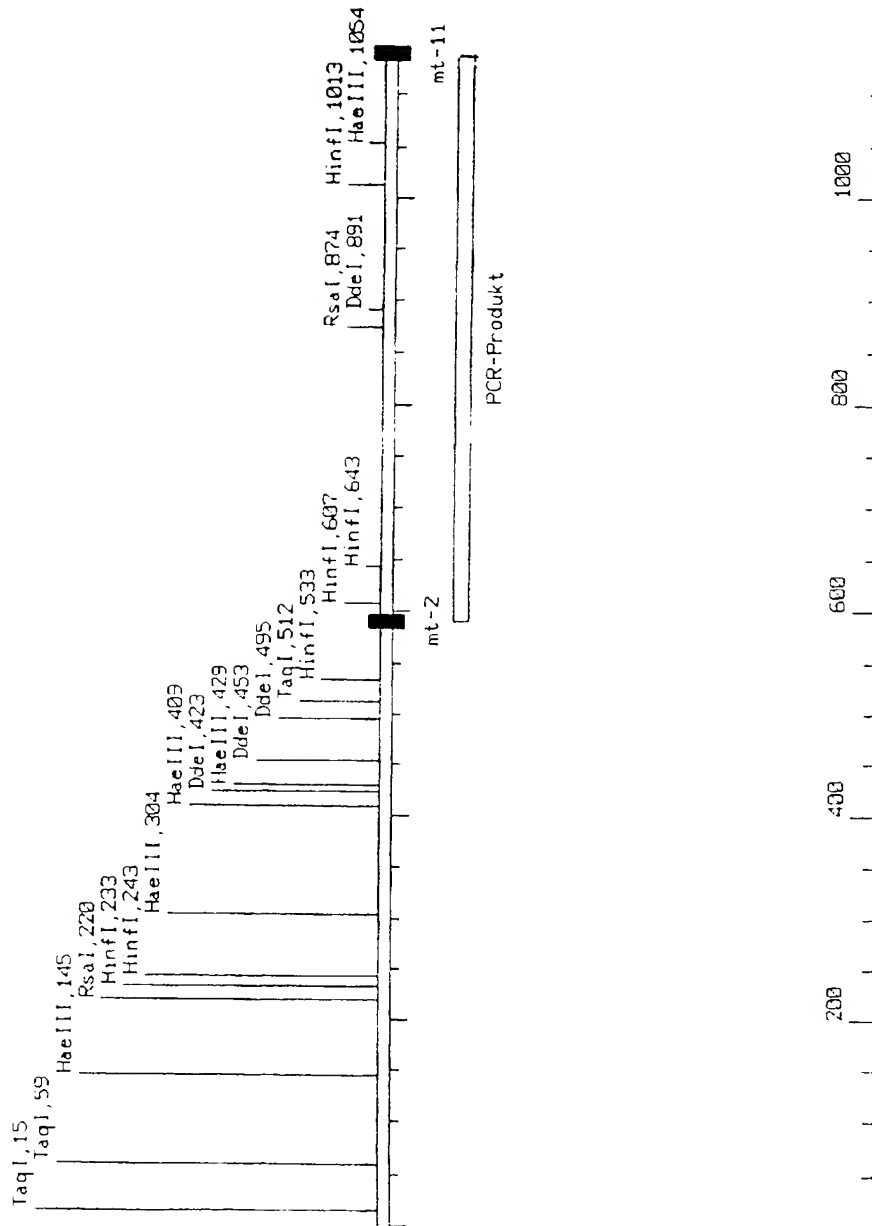


Fig. 1: Restriktionskarte des Cytochrom b Gens von *Gallus gallus* (Huhn)

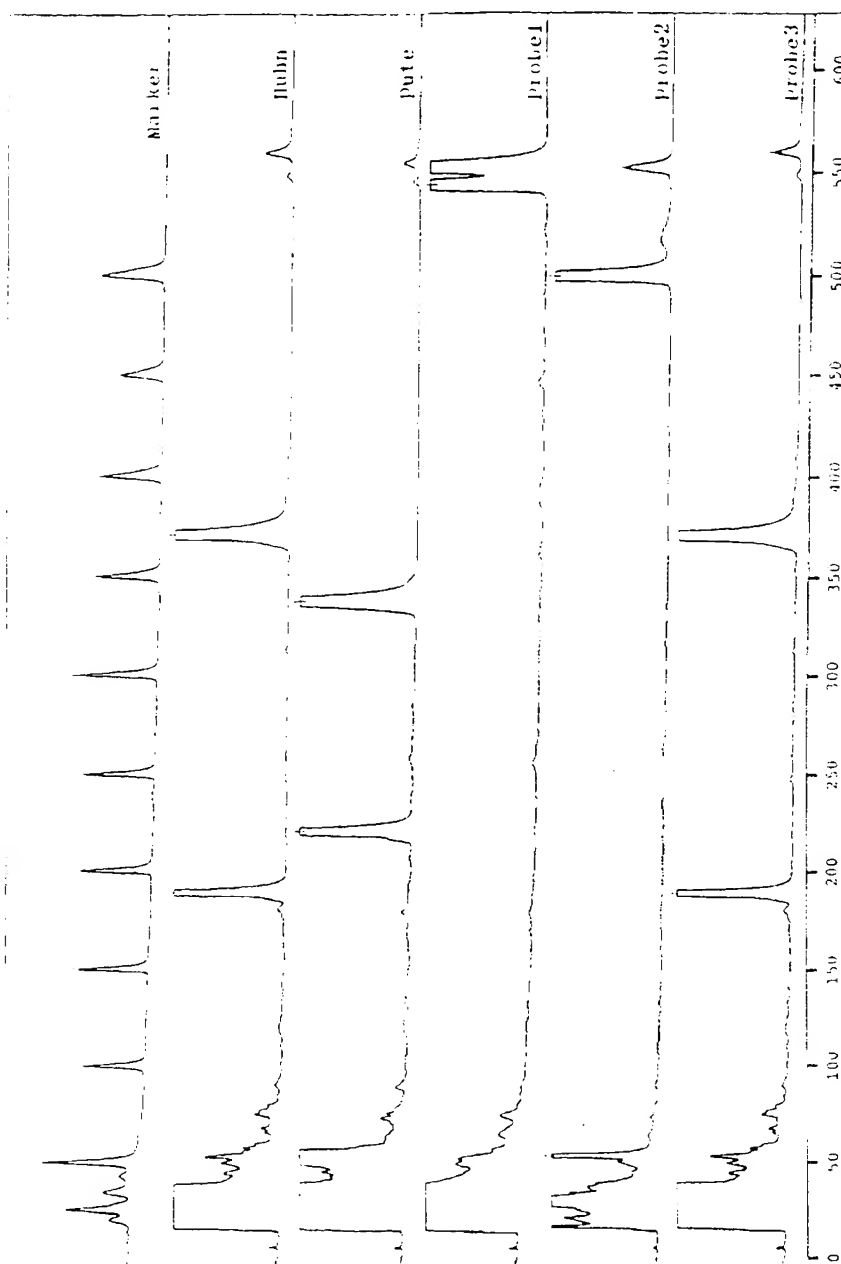


Fig. 2: Probeanalyse des PCR-Fingerprinting Verfahrens mit dem laserunterstützten "on-line" System